

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-101281

(43) 公開日 平成9年(1997)4月15日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	27/327		G 0 1 N 27/30	3 5 3 J
	27/416		27/46	3 3 8

審査請求 未請求 請求項の数6 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-284580

(22) 出願日 平成7年(1995)10月5日

(71) 出願人 000004385

エヌオーケー株式会社

東京都港区芝大門1丁目12番15号

(72) 発明者 後藤 正男

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ
オーケー株式会社内

(72) 発明者 牟礼 博樹

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ
オーケー株式会社内

(74) 代理人 弁理士 吉田 俊夫

(54) 【発明の名称】 グルコースバイオセンサ

(57) 【要約】

【課題】 原液測定に用いた場合にあって、直線検量性および再現性にすぐれているグルコースバイオセンサを提供する。

【解決手段】 少なくとも1つの電極面上に、(1)グルコースオキシダーゼ含有光硬化樹脂膜およびパラベンゾキノン層、(2)グルコースオキシダーゼ含有光硬化樹脂膜、パラベンゾキノン層および塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層、(3)グルコースオキシダーゼおよびパラベンゾキノン含有する光硬化樹脂膜、(4)グルコースオキシダーゼおよびパラベンゾキノン含有する光硬化樹脂膜および塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層、(5)グルコースオキシダーゼおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウム含有する光硬化樹脂膜およびパラベンゾキノン層あるいは(6)グルコースオキシダーゼ、パラベンゾキノンおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウム含有する光硬化樹脂膜を(順次)形成させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性基板上に作用極および対極または作用極、対極および参照極を設けたグルコースバイオセンサにおいて、少なくとも1つの電極面上にグルコースオキシダーゼ含有光硬化樹脂膜およびパラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウム層を順次形成せしめてなるグルコースバイオセンサ。

【請求項2】 パラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウム層上に更に塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層を形成させた請求項1記載のグルコースバイオセンサ。

【請求項3】 絶縁性基板上に作用極および対極または作用極、対極および参照極を設けたグルコースバイオセンサにおいて、少なくとも1つの電極面上にグルコースオキシダーゼおよびパラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウムを含有する光硬化樹脂膜を形成せしめてなるグルコースバイオセンサ。

【請求項4】 光硬化樹脂膜上に更に塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層を形成させた請求項3記載のグルコースバイオセンサ。

【請求項5】 絶縁性基板上に作用極および対極または作用極、対極および参照極を設けたグルコースバイオセンサにおいて、少なくとも1つの電極面上にグルコースオキシダーゼおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含有する光硬化樹脂膜およびパラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウム層を順次形成せしめてなるグルコースバイオセンサ。

【請求項6】 絶縁性基板上に作用極および対極または作用極、対極および参照極を設けたグルコースバイオセンサにおいて、少なくとも1つの電極面上にグルコースオキシダーゼ、パラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウムおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含有する光硬化樹脂膜を形成せしめてなるグルコースバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、グルコースバイオセンサに関する。更に詳しくは、直線検量性および再現性にすぐれたグルコースバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】従来のグルコースバイオセンサを用いてのグルコース濃度の測定方法では、測定試料を電極表面に滴下もしくは注入した後一定電位を電極に与え、一定時間後の電流値を測定するポテンシャルステップ法がとられており、試料溶液が希釈かつ連続供給されないため、酵素反応に必要な溶存酸素量が不足し、検量範囲が狭いという欠点が見られる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、絶縁性基板上に作用極および対極の少なくとも2電極を設

け、作用極面上などにグルコースオキシダーゼ含有光硬化樹脂膜を形成せしめたグルコースバイオセンサであって、原液測定に用いた場合にあっては、直線検量性および再現性にすぐれているものを提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】かかる本発明の目的は、絶縁性基板上に作用極および対極または作用極、対極および参照極を設けたグルコースバイオセンサにおいて、少なくとも1つの電極面上に

- 10 (1)グルコースオキシダーゼ含有光硬化樹脂膜およびパラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウム層
- (2)グルコースオキシダーゼ含有光硬化樹脂膜、パラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウム層および塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層
- (3)グルコースオキシダーゼおよびパラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウムを含有する光硬化樹脂膜
- (4)グルコースオキシダーゼおよびパラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウムを含有する光硬化樹脂膜および塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層
- 20 (5)グルコースオキシダーゼおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含有する光硬化樹脂膜およびパラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウム層
- (6)グルコースオキシダーゼ、パラベンゾキノンまたはフェリシアン化カリウムおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含有する光硬化樹脂膜を(順次)形成せしめたグルコースバイオセンサによって達成される。

【0005】

【発明の実施の形態】絶縁性基板としては、ガラス、セラミックス、プラスチック、紙、生分解性材料(例えば、微生物生産ポリエステル等)などが用いられる。このような絶縁性基板上への作用極および対極の形成は、いずれも白金、銀、金、カーボン等の電極形成材料を用いて、蒸着法、スパッタリング法、スクリーン印刷法、メッキ法などの一般的な薄膜形成方法によって行われる。

【0006】また、参照極が更に形成される場合には、銀/塩化銀電極として形成される。銀/塩化銀電極の形成は、一般的に行われている方法、即ち白金、金、カーボン等からなる参照極リード上に、スクリーン印刷法、蒸着法、スパッタリング法などによって一旦銀電極を形成させた後、定電流電解する方法あるいは塩化第2鉄水溶液中に浸漬する方法、更にはスクリーン印刷法によって塩化銀を塗布、積層させる方法などによって行われる。

【0007】これらの各電極の少なくとも1つの電極、好ましくはそこに設けられたすべての電極に、前記態様(1)～(6)に記載された各種の光硬化樹脂膜(およびパラベンゾキノン層あるいは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層)が形成される。

50 【0008】前記(1)の態様の場合には、まずグルコー

スオキシダーゼ(GOD)含有光硬化樹脂膜の形成が行われる。

【0009】かかるGOD含有光硬化樹脂膜の形成は、スチルバゾリウム基、スチリルピリジニウム基等の光架橋性基を約0.5~3.5モル%程度含有するポリビニルアルコール(けん化価約70~100、重合度約500~4000)によって代表される光硬化性樹脂を約5~50重量%、好ましくは約10~20重量%の濃度で溶解させた水溶液に、GOD(例えば、11.1%光架橋性PVA水溶液3.6gに対して165,800単位/g固形物のGODを約10~200mg)および蒸留水を加え、全量を約5~10gとしたドープ液を調製し、これの適量をスピナー等で電極面を覆うように滴下、塗布し、約10~30℃の温度で約0.5~2時間程度乾燥させ、次いで紫外線を所定時間(約0.5~10分間程度)照射するなどして光架橋させ、必要に応じて水洗、現像を行って、膜厚が約0.05~10μm、好ましくは約0.1~2μmの光硬化膜を形成させる。

【0010】このように形成されたGOD含有光硬化樹脂膜上には、パラベンゾキノン層の形成が行われる。パラベンゾキノン層の形成は、パラベンゾキノンとして約1~200mM、好ましくは約50~150mMとなる量のパラベンゾキノン溶解させた水溶液を樹脂膜上に滴下し、一般には室温条件下で乾燥させることによって行われ、そこにパラベンゾキノン含浸樹脂膜を形成させる。

【0011】また、前記(3)の態様の場合には、GOD含有光硬化樹脂膜上にパラベンゾキノン層を含浸層として形成させるために、(1)で用いられるドープ液中に予め約10~200mM、好ましくは約50~150mMとなる量のパラベンゾキノン溶解させたドープ液が約0.5~10μl程度用いられ、所定の電極面上にグルコースおよびパラベンゾキノン含有する光硬化樹脂膜を形成させることが行われる。

【0012】前記(2)および(4)の態様では、それぞれ(1)のパラベンゾキノン層上または(3)の光硬化樹脂膜上に、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層の形成が行われている。これらの塩化物は水溶液として滴下され、乾燥させることにより、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム層を形成させる。その量は、測定液の添加時の最終濃度が約1~2000mM、好ましくは約10~100mMとなるような量である。なお、これらの塩化物は、紙、ポリアクリルアミドゲル、酢酸ビニル-アクリル酸共重合体けん化物等に含浸、支持させた状態で用いることもできる。

【0013】更に、前記(5)の態様では、前記(1)のGOD含有光硬化樹脂膜の形成に用いられたドープ液中に塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを添加したものが用いられ、そこに形成されたグルコースオキシダーゼおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含有する光硬化樹脂膜上へのパラベンゾキノン層の形成が(1)の場合と同様に行われる。

【0014】また、前記(6)の態様では、前記(3)の光硬

化樹脂膜の形成に用いられたドープ液中に更に塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを添加したものが用いられ、グルコースオキシダーゼ、パラベンゾキノンおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含有する光硬化樹脂膜が形成されている。

【0015】これら(5)および(6)の態様で用いられる塩化ナトリウムまたは塩化カリウムの量は、測定液の添加時における最終濃度が約1~200mM、好ましくは約10~100mMとなるような量である。また、(6)の態様におけるパラベンゾキノン量は、(3)の場合と同様に用いられる。

【0016】(1)~(6)のいずれかが実施された後、各電極の中央部分はシリコーン樹脂、ポリイミド樹脂、エポキシ樹脂等の絶縁膜によって被覆される。また、このような各態様は、パラベンゾキノンと同効のメディエータ(電子伝達体)であるフェリシアン化カリウムを用いても、同様に実施することができる。

【0017】このようにして構成されるグルコースバイオセンサを用いてのグルコース濃度の測定に際しては、グルコース水溶液約1~100μlを作用極膜に滴下し、約1~120秒間程度反応を進行させた後、約0.05~0.8V、好ましくは約0.4~0.7Vの電圧を印加し、例えば印加20秒後の電流値を測定することが行われる。

【0018】

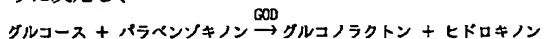
【作用】および

【発明の効果】グルコースは、酸素の共存下においてGODによって酸化され、そのとき発生したH₂O₂を作用極上で酸化し、その際発生する酸化電流値を測定することにより、グルコース濃度を間接的に求め得ることは一般に知られている。

【0019】この場合、測定液が希釈されて用いられるバッチ方式やFIA(フローインジェクションアナリシス)方式の測定法では、水溶液中の溶存酸素濃度が8ppm(0.3mM、25℃)程度であっても、制限透過膜の設置等の手段を用いることによって、十分に検量性を確保することができる。

【0020】しかしながら、溶液の希釈が行われない原液測定液の場合には、酵素反応が溶存酸素濃度に律速されるため、グルコース濃度が100mg/dl程度迄しか直線検量範囲が確保されないのが実情である。そこで、本発明においては、溶液中濃度が有限である酸素の代わりに、電子伝達体としてのパラベンゾキノンが用いられる。

【0021】パラベンゾキノン^{GOD}は、グルコースと次のように反応し、



この際発生したヒドロキンは作用極において酸化され、酸化電流を生ずる。

【0022】



ここで、パラベンゾキノンの添加量は任意であるため、

センサの検量範囲は溶存酸素に律速されることはなくなる。フェリシアン化カリウムも、電子伝達体として同様に作用する。

【0023】このようにして、溶存酸素濃度を律速とすることなく、酵素反応によってグルコース濃度を間接的に測定することが可能となるが、そこに塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを共存させると、その測定値の再現性を示す変動係数の値を小さくすることができる。

【0024】従って、本発明に係るグルコースバイオセンサは、原液を迅速かつ簡便に測定する使い捨てセンサとして、家庭内健康診断(セルフケア)、特に血糖値、尿糖値の測定による糖尿病の自己管理、糖尿病の予防などに効果的に用いられるばかりではなく、食品製造工程中のグルコース量管理などにも有効に用いることができる。

【0025】

【実施例】次に、実施例について本発明を説明する。

【0026】実施例1(パラベンゾキノン滴下)

アルミナ基板(京セラ製品A-493)上に、白金対極、白金作用極および白金参照極リードをいずれも4000Åの膜厚で蒸着法によって形成させた。次いで、参照極リード上にスクリーン印刷法で銀ペースト(アサヒ化学研究所製品LS-504J)を印刷し、焼成して銀電極とした。この銀電極部分を0.1M塩酸中に浸漬し、0.6mA/cm²の電流密度で20分間の定電流電解を行い、参照極リード表面を塩化銀化し、銀/塩化銀参照極を形成させた。この定電流電解には、ポテンショガルバノスタット(北斗電工製HA-501)*

*が用いられた。

【0027】光架橋性ポリビニルアルコール(東洋合成工業製品;スチルバゾリウム基含有率1.3モル%、重合度1700、けん化価88)の11.1%水溶液3.6gに、グルコースオキシダーゼ(シグマ社製品;タイプVII-S、G7016、165800単位/g固形物)16.6mgおよび蒸留水3.46gを順次加えて、ドープ液を調製した。このドープ液2.5μlを、作用極上にスピナ塗布し(200rpm、15秒間)、室温下に1時間放置した後、紫外線を4分間照射して、グルコースオキシダーゼを光架橋ポリビニルアルコール膜中に包括固定化させた。その後、この膜上に150mMパラベンゾキノン水溶液5μl(パラベンゾキノンとして0.08mg)を滴下し、室温条件下で乾燥させた。その後、ポリエステルによる絶縁膜の形成が、各電極の中央部分を覆うようにして行われた。

【0028】このようにして作製されたグルコースバイオセンサに、所定濃度のグルコース水溶液40μlを作用極膜上に滴下し、5秒間反応を進行させた後0.6Vの電圧を印加し、印加20秒後の電流値を測定した。測定には、ポテンショガルバノスタット(HA-501)およびファンクションジェネレータ(北斗電工製HB-104)が用いられた。

【0029】比較例

実施例1において、パラベンゾキノンの添加が行われなかった。

【0030】実施例1および比較例における測定結果(単位:μA)は、次の表1および図1のグラフに示される。

表1

グルコース濃度(mg/dl)	実施例1	比較例
0	25	31
50	40	60
100	65	97
250	135	135
500	220	148
800	310	149
1000	390	150

【0031】これらの結果から、実施例1においてはグルコース濃度0~1000mg/dlの範囲内で直線検量性が示されるのに対し、比較例ではグルコース濃度0~100mg/dlでしか直線検量性が示されることが分かる。また、グルコース濃度100mg/dlでのセンサ間の再現性を示す変動係数(n=10)は、実施例1では4.0%、比較例では4.5%であった。

【0032】更に、参照極を設けないグルコースバイオセンサでは、実施例1および比較例の直線検量性はそれぞれ上記濃度範囲と同じであり、また変動係数は実施例1では4.5%、比較例では5.2%であった。

【0033】実施例2(パラベンゾキノン添加ドープ液として使用)

実施例1において、パラベンゾキノン226mgをドープ液 ※50

※中に添加し、その2.5μl(パラベンゾキノンとして0.08mg)をスピナ塗布する形で、パラベンゾキノンが用いられた。得られたグルコースバイオセンサの直線検量範囲はグルコース濃度0~1000mg/dl(参照極を用いない場合も同じ)であり、また変動係数は、4.1%(参照極を用いない場合は4.7%)であった。

【0034】実施例3(パラベンゾキノン滴下-NaCl滴下)

実施例1で作製されたセンサの作用極膜上、対極上(および参照極上)の少なくとも1個所に50mMの塩化ナトリウム水溶液を滴下し、室温下で乾燥させた。得られたグルコースバイオセンサについての再現性が、変動係数として評価された。

【0035】実施例4(NaCl添加ドープ液-パラベンゾ

キノン滴下)

実施例1において、塩化ナトリウムが最終濃度50mMとなる量で添加されたドープ液が用いられ、得られたセンサの再現性が同様に評価された。

【0036】実施例5（パラベンゾキノン添加ドープ液-NaCl滴下）

実施例2で作製されたセンサの作用極膜上、対極上（および参照極上）の少なくとも1個所に50mMの塩化ナトリウム水溶液を滴下し、室温下で乾燥させた。得られたセンサの再現性が、同様に評価された。

*【0037】実施例6（パラベンゾキノン-NaCl添加ドープ液として使用）

実施例2において、更に塩化ナトリウムが最終濃度50mMとなる量で添加されたドープ液が用いられ、得られたセンサの再現性が同様に評価された。

【0038】実施例3～6において得られた参照極を用いた場合と用いない場合の変動係数は、次の表2に示される。なお、グルコース濃度の直線検量範囲は、いずれの場合にも0～1000mg/dlであった。

* 10

表2

実施例	参照極	処理電極	変動係数(%)
3	あり	なし	4.0
		参照極	3.2
		作用極	3.6
	なし	3電極	3.4
		なし	4.5
		対極	4.0
4	あり	作用極	4.3
		作用極、対極	4.1
		作用極	3.6
	なし	3電極	3.4
		作用極	4.3
		作用極、対極	4.0
5	あり	なし	4.1
		参照極	3.3
		作用極	3.8
	なし	3電極	3.5
		なし	4.7
		対極	4.2
6	あり	作用極	4.5
		作用極、対極	4.4
		作用極	3.8
	なし	3電極	3.5
		作用極	4.4
		作用極、対極	4.2

【図面の簡単な説明】

※度と出力との関係を示す検量線グラフである。

【図1】実施例1および比較例におけるグルコース濃※

【図1】

